

⑨ 日本国特許庁(J P)

⑩ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報(A)

平5-503281

⑬ 公表 平成5年(1993)6月3日

⑭ Int. Cl. ⁹	識別記号	庁内整理番号	審査請求	未請求	予備審査請求	有	部門(区分)	3(2)
A 61 K 39/395	ADY D	8413-4C 7236-4B 8828-4B	C 12 N	5/00 15/00			B C※	

(全 13 頁)

⑮ 発明の名称 細胞アポトーシスを伴う細胞表面抗原

⑯ 特 願 平2-502015
⑰ 出 願 平2(1990)1月19日

⑱ 翻訳文提出日 平4(1992)7月16日
⑲ 国際出願 PCT/EP90/00111
⑳ 国際公開番号 WO91/10448
㉑ 国際公開日 平3(1991)7月25日

㉒ 発明者 クラマー、ベーター・エイチ ドイツ連邦共和国デー6900ハイデルベルク・イムノイエンハイマーフェルト280
㉓ 出 願 人 ジャーマン・キャンサー・リサーチ・センター ドイツ連邦共和国デー6900ハイデルベルク・ビーオーボックス10 19 49
㉔ 代理人 弁理士 小田島 平吉
㉕ 指 定 国 A T(広域特許), B E(広域特許), C A, C H(広域特許), D E(広域特許), D K(広域特許), E S(広域特許), F R(広域特許), G B(広域特許), I T(広域特許), J P, L U(広域特許), N L(広域特許), S E(広域特許), U S

最終頁に続く

摘 求 の 範 囲

1. 52 k D細胞膜抗原と特異的に結合し、成長阻害又は細胞アポトーシスを誘起する、単クローン性抗体、フラグメント又はその類似体。
2. マウス由来の、請求の範囲1に記載の単クローン性抗体。
3. キメラである、請求の範囲1に記載の単クローン性抗体。
4. 一重鎖抗体である、請求の範囲1に記載の単クローン性抗体の類似体。
5. アポトーシスを伴う52 k D細胞膜に特異的な単クローン性抗体。
6. 52 k D細胞膜抗原と特異的に結合し、細胞アポトーシスを誘起する単クローン性抗体、フラグメント又はその類似体を生産する連続細胞系。
7. ハイブリドーマである、請求の範囲6に記載の連続細胞系。
8. 分子量が約52 k Dであり、細胞アポトーシスを伴う、単離細胞膜抗原。
9. 生理学的に許容できるビヒクル中に請求の範囲8に記載の抗原、又はその免疫原性ペプチドエピトープを含む、免疫原組成物。
10. アポトーシス-誘起量の、アポトーシスを伴う52 k D細胞膜抗原と特異的に結合することによりアポトーシスを誘起する抗体に、細胞を接触させることを含む、細胞中にアポトーシスを誘起する方法。
11. 細胞がリンパ球である、請求の範囲10に記載の方法。
12. 腫瘍に苦しむ患者に、アポトーシス-誘起量の、アポトーシスを伴う52 k D細胞膜抗原と特異的に結合することによりアポトーシスを誘起する抗体を投与することを含む、腫瘍の治療法。
13. 抗体が単クローン性抗体である、請求の範囲12に記載の方法。

14. 抗体がキメラ抗体である、請求の範囲13に記載の方法。
15. 腫瘍がリンパ腫である、請求の範囲12に記載の方法。
16. 腫瘍が成人T細胞白血病である、請求の範囲14に記載の方法。

細胞アポトーシスを伴う細胞表面抗原

背景

細胞表面分子は、リンパ球成長調節において重要な役割を果たす。そのような分子は、成長誘発サイトカインのレセプターとして機能するか、又はレセプターと共働して成長調節に必須の信号を伝達することができる。レセプター結合又は刺激サイトカインの除去により、リンパ球の成長を減退させることができる。例えばインターロイキンがないとヒトリンパ球の成長は遅くなり、最終的に“計画的細胞死”又はアポトーシス (Apoptosis) と呼ばれる細胞死の特徴的形態に至る。E. Duvall and H. H. Wyllie, Immunol. Today 7, 115 (1986)。アポトーシスは、真核細胞死の最も普通の形態であり、胚形成、癌、組織萎縮及び腫瘍進行において起こる。A. H. Wyllie, J. F. R. Kerr, A. R. Currie, Int. Rev. Cytol. 68, 251 (1980)。又これは、細胞障害性Tリンパ球及びナチュラルキラーならびにキラー細胞により、腫瘍壊死因子 (TNF) 及びリントキシン (LT) などのサイトカインにより、及びグルココルチコイドによっても起こる。アポトーシスの特徴的徴候は、核の分割、細胞質の濃縮、膜ブレイング (ゼイオシス) 及びDNAの約180塩基対の多量体へのフラグメント化 (“DNAラダー”と呼ばれる) である。

最近、抗-CD3が試験管内で未熟脾臓リンパ球のアポトーシスを

抗原APO-1は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により決定する分子量が約52kDの細胞膜抗原である。APO-1は、活性化された正常なヒトリンパ球、及びB細胞、T細胞ならびにHTLV-1-付随性細胞、例えば成人T細胞白血病細胞などを含むリンパ球腫瘍細胞により発現する。抗-APO-1抗体の細胞への結合によりAPO-1が発現し、成長阻害及び/又はアポトーシスを起こす。この効果は、補体非依存性であり、抗体のみによって媒介される。

APO-1は、抗原を発現する細胞 (リンパ球など) の細胞膜から従来の方法により単離することができる。さらにAPO-1をコードする遺伝子をクローニングして発現させ、単離抗原又はその一部を得ることができる。単離APO-1を免疫原として使用し、抗-APO-1抗体 (多クローン性又は単クローン性) を誘起する、あるいはハイブリドーマによる抗-APO-1抗体、トランスフェクションした骨髄腫によるキメラ抗-APO-1抗体、又は形質転換バクテリア細胞による1重鎖抗体-APO-1抗体の製造のためのスクリーニングを行うことができる。

APO-1に結合する抗体は、APO-1を発現する細胞中における細胞成長の阻害又はアポトーシスの誘導に有用である。この目的の場合、単クローン性抗-APO-1抗体が好ましい。単クローン性抗-APO-1抗体は、選択的 (生存) 安定抗体-生産細胞系により製造する。好ましい抗体-生産細胞系は、ハイブリドーマ細胞系である。しかし原則的に細胞系は、抗-APO-1特異性のL及び/又はH鎖の可変領域をコードする機能的転写遺伝子を含み、発現することができるどのような細胞からも誘導することができる。細胞系は、純粋な機能的抗体又は抗

引き起こすことが示された。C. A. Smith等, Nature 337, 181 (1989)。CD3-誘起アポトーシスが、胸腺のT細胞の負の選択を担うことが示された。

腫瘍細胞などの細胞におけるアポトーシスの選択的誘導は、有用な治療手段であることを証明することができた。

発明の要約

本発明は、細胞アポトーシスを伴うAPO-1と呼ばれる細胞表面抗原、及びAPO-1と特異的に結合し、細胞成長の阻害又は細胞アポトーシスを引き起こす抗体、そのフラグメント又は類似体などの結合剤に関する。APO-1は、分子量が約52kDであり、活性化及び感受性リンパ球により発現する。APO-1への抗体の結合はアポトーシスを引き起こし、従って抗体又は類似結合剤を、APO-1抗原を持つリンパ球腫瘍細胞などの細胞において成長阻害又はアポトーシスを起こすのに使用することができる。

図面の簡単な説明

図1は、APO-1の分子量決定のためのSDSポリアクリルアミド電気泳動ゲルのオートラジオグラムを示す。

図2は、抗-APO-1による成長阻害及びアポトーシスの誘導を示す。

図3は、マウスにおけるリンパ腫の抗体-APO-1誘導進行を示す。

図4は、リンパ球腫瘍の異種移植における抗-APO-1抗体の局在化を示す。

発明の詳細な説明

体フラグメントに組み立てる能力を有することが好ましい。従って自然に免疫グロブリンを生産するリンパ球が好ましい。

単クローン性抗体-APO-1抗体を生産するハイブリドーマ細胞は、Kohler and Milstein, nature 256:495 (1975) の標準細胞ハイブリッド形成法により作ることができる。簡単に言うと方法は、以下の通りである：APO-1を持つ全細胞又はそれらの細胞の細胞膜を用いて動物を免疫原化することにより単クローン性抗-APO-1抗体を生産する。代わりに、精製又は部分的精製APO-1、あるいはAPO-1の1個又はそれ以上の免疫原エピトープを持つペプチドセグメントを用いて動物を免疫原化することができる。そのようなペプチドは合成し、キーホールリンベットヘモシアニンなどのキャリアタンパク質と複合化し、免疫原として使用することができる。

免疫感作に好ましい動物は、マウスである。種々の免疫感作法を使用することができる。例えばマウスに約107のAPA-1-保持細胞を、週1度、4週間かけて腹腔内注射により与えることができる。

その後免疫感作動物から抗体-生産リンパ球 (例えば脾臓リンパ球) を得、生存細胞 (好ましくは骨髄腫又は異種骨髄腫) と融合させる。多くの適した骨髄腫細胞が、文献により周知である。マウスハイブリドーマの場合の例として、骨髄腫P3, X63, Ag8, 653がある。Kohler and Milstein, 同上を参照。脾臓細胞と融合相手の融合は、ポリエチレングリコールの存在下で確立された方法に従うことができる。電気融合法も使用することができる。

得られた雑種細胞をクローン増殖した後、抗-APO-1抗体の生産

に関してスクリーニングする。ハイブリドーマを、APO-1抗原を発現する細胞系に対してアポトーシスを誘起する抗体の分泌に関してスクリーニングすることができる。そのような細胞系の例は、悪性ヒトB細胞系SKW6、4である。さらに別の細胞系を下表1に示す。複製又は部分的複製APO-1を、APO-1特異性の抗体を分泌するハイブリドーマに関する、標準的免疫吸着剤分析によるスクリーニングに使用することができる。

動物の抗体はヒトの治療に有用であり得るが、動物の抗体を産生してヒトによる耐性がより高い形態にすることが好ましい。マウス又は他の動物中で生産した単クローン性抗体を、標準的方法によりキメラ動物/ヒト抗体又は“ヒト型”抗体に変換することができる。

抗-APO-1抗体の類似体のAPO-1-結合フラグメントも製造することができる。例えば酵素消化によりF(ab')₂、Fab及びF₂を製造することができる。さらにFab及びF₂類似体(一重鎖抗体)に相当する合成オリゴペプチドを、バクテリア細胞中で遺伝子工学により製造することができる。

抗体を用いてリンパ球(正常又は悪性)あるいはAPO-1を持つ他の細胞中に成長阻害又はアポトーシスを誘起することができる。例えば抗-APO-1抗体を使用してAPO-1抗原を持つ腫瘍を治療することができる。上記の通り、APO-1を発現する種々の種類の悪性リンパ球において、抗体により成長阻害及び/又はアポトーシスを誘起することができる。これらの悪性リンパ球には、悪性B又はT細胞が含まれる。特に成人T細胞白血病、HTLV-1付随腫瘍を抗-APO-1抗体を用いて治療することができる。さらにAPO-1を持つ赤リン

パ球腫瘍は、抗体治療に関する候補である。

APO-1を持つ細胞の成長阻害又はアポトーシスを誘起する量の抗-APO-1抗体を、腫瘍に苦しむ患者に投与する。有効な抗-APO-1抗体及び投与量は、種々の腫瘍の種類に関して決定することができる。一般に抗体は、食塩水などの薬用ビヒクルに溶解して静脈注射により与えることができる。

APO-1を発現するリンパ球は、体外的に治療することもできる。血球又は白血球を患者から取り除き、腫瘍細胞を減少させる又は除去するのに十分な量の抗-APO-1抗体と接触させる。処理後、血球又は白血球を患者に戻す。

抗体は又、細胞によるAPO-1の発現を決定するために診断的に使用することもできる。例えば抗-APO-1抗体を使用して、APO-1の発現に基づく正常及び悪性リンパ球のサブセットを定義することができる。この目的のために、細胞表面抗原の決定のための従来の分析法を使用することができる。例えば個々の細胞の試料を、抗体が細胞表面上のAPO-1と結合することができる条件下で抗-APO-1抗体と共にインキュベートする。抗-APO-1抗体に向けられた第2の抗体を使用して結合を検出する(例えば抗-APO-1抗体がマウスの抗体の場合、第2の抗体は羊抗-マウス抗体であることができる)。第2の抗体は、好ましくは酵素又は蛍光分子を用いて標識する。標識抗体と共に細胞をインキュベーションした後、細胞に伴う標識を細胞により発現したAPO-1を示すものとして検出する。

以下の実施例により、発明をさらに説明する。

実施例

実施例1

方法

抗-APO-1抗体の製造

1週間一度づつ4週間かけて 1×10^6 のSKW6、4を腹腔内注射することにより、BALB/cマウスを免疫感作した。最後の注射から4日後、免疫感作動物からの脾臓細胞をP3、X63、Ag8、653骨髄細胞と融合した[G. Kohler and C. Milstein, *Nature* 256, 495 (1975)]。融合後12日に、SKW6、4細胞の成長に関して陽性のウェルからの培養上澄み液を、SKW6、4細胞の成長を阻害する能力に関して調べた。阻止単クローン性抗体(MAb)を生産するハイブリドーマを、1ウェル当たり0.5細胞の濃度における限界希釈により3回クローニングした。タンパク質A-Diasepカラム(Diagen, Dusseldorf, FRG)を用いて無血清培養上澄み液からMAbを精製した。結合MAbを、0.1M NaCl及び0.1Mグリシン、pH2.8を用いて溶離し、リン酸緩衝食塩水に対して透析し、滅菌した。ホースラディッシュペルオキシダーゼと複合化したアイソタイプ特異的羊抗-マウスIg(Dunn, Asbach, FRG)を用いた酵素結合免疫ソルベント分析[S. Kiesel等, *Leuk. Res.* 11, 1119 (1987)]により、MAbのアイソタイプを決定した。

結合アフィニティー及び結合部位の数の決定

細胞当たりの抗-APO-1結合部位のアフィニティー及び数を、細胞のスクエッチャード分析により決定した[I. von Hoegen, W. Falk, G. Kojouharoff, P. H. Krammer,

Eur. J. Immunol. 19, 239 (1989)]。簡単に言うと、¹²⁵IODO-Gene法によりMAbsをヨウ素化した[P. J. Fraken and J. C. Speck, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80, 849 (1980)]。 5×10^4 細胞のアリコート、0.1%のNaN₃及び種々の濃度の¹²⁵I-標識MAbを含む200μlの培地に再懸濁した。4℃にて4時間のインキュベーションの後、95μlの2部分を取り出し、von Hoegen等により上記に記載した通り遠心した。

分子量決定のためのSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

細胞(3×10^6)を、6mlの無メチオニン培地(Biochrom, Berlin)中の60μCiの¹²⁵Se-標識メチオニン(Amersham, Braunschweig, FRG)を用いて48時間標識した。洗浄後、細胞を標準MAb又は抗-APO-1(1μg/ml)中、4℃にて45分間インキュベートした。細胞を洗浄し、溶菌緩衝液(トリス-緩衝食塩水、pH7.3、1% Nonidet P-40、1mMフェニルメチルスルホニルフルオリド、0.1%アプロチニン)中に室温にて30分間再懸濁した。溶菌生成物を遠心し、上澄み液をタンパク質A-セファロースビーズ(Pharmacia, Uppsala, Sweden)と共に4℃にて1時間インキュベートした。免疫複合体を緩衝液(トリス-緩衝食塩水、pH7.3、0.25% Nonidet P-40)を用いて4回洗浄し、5%のSDS及び5%の2-メルカプトエタノールを含むSDS-PAGE試料緩衝液中に再懸濁した。試料を95℃に加熱し、遠心し、γ-カウンタ中で上澄み液の

分当たりのカウントを決定した。各列に合計15,000cpmを負荷し、10%SDS-PAGEにより分析した(V. K. Laemmli, Nature 277, 680 (1970))。ゲルを乾燥し、オートラジオグラフィにかけた。オートラジオグラフを図1に示す;バンドは、アイソタイプ適合標準MAb(左列)又は抗-APO-1(右列)を用いた生合成標識APO-1の免疫沈降を示す。左空白の数は、サイズマーカーの位置を示す。

抗-APO-1による成長阻害及びアポトーシスの誘起

(A) T細胞系CCRF-CEM, S2を、マイクロタイタープレート中、標識MAb(1 μ g/ml)の存在下で2時間培養し、検影した(図2の左パネル、標準MAb 13B1;右パネル、抗-APO-1)。96-ウェルマイクロタイタープレート中、限界希釈条件下で、1ウェル当たり1細胞にてCCRF-CEM, S2 T細胞系から細胞をクロニングすることにより、CCRF-CEM, S2サブクローンを得た。CCRF-CEM, S2は、4時間培養物中の陽性細胞検査により測定して、APO-1(500ng/ml)により誘起される計画細胞死に対する感受性が高いので選んだ。(B) CCRF-CEM, S2細胞(1ml当たり10⁴)を、37℃の培地中でMAb(1 μ g/ml)と共にインキュベートした。種々の時点で10⁴細胞のアリコートを取出し、DNAを調製した。図2Bにおいて、M_rマーカー:1, 2時間の場合の標準MAb 13B1;列3-7、示した時間の場合の抗-APO-1。(C) SKW8, 4細胞を、アイソタイプ適合標準MAb FI120(□)、FI123(非結合MAb)(○)又は抗-APO-1(●)と共に微量培養中で24時間インキュベートし、さらに4時間 [³H]

チミジンを用いて標識した。データは、二重培養の平均を示し、変動は5%以下である。細胞は、2mMのL-グルタミン、ストレプトマイシン(100 μ g/ml)、ペニシリン(100U/ml)、20mMのヘブス緩衝液pH7.3、及び10%の無-失活牛胎児血清(Conc o Lab-Division, Wiesbaden, FRG)を備ったRPMI1640培地(Gibco, Grand Island, New York)中で培養した。微量培養の場合、平底96-ウェルマイクロタイタープレート(Tecnomara, Fernwald, FRG)中で1ウェル当たり1 \times 10⁴細胞を二重に培養した(1ウェル当たり最終体積200 μ l)。24時間後、0.5 μ Ciの [³H]チミジン(Amersham, Braunschweig, FRG)を用いて4時間標識した。収穫の前に、微量培養を収容試験管により調べた。DNAフラグメント化1 \times 10⁴細胞を冷リン酸緩衝食塩水で洗浄し、1%のSDS及びプロテイナーゼK(0.2mg/ml)を含むNTE緩衝液pH8(100mM NaCl, 10mMトリス, 1mM EDTA)を用いて分析した。37℃で24時間インキュベート後、フェノール及びクロロホルム(1:1, v/v)を用いて2回抽出し、エタノールで沈降させた。DNAを38 μ lのNTE緩衝液中に溶解し、37℃にてリボヌクレアーゼ(1mg/ml)を用いて30分間消化した。各試料に、TBE緩衝液(2mMのEDTA, 89mMの酢酸, 89mMのトリス, pH8.4)中に15%のFicoll1400(Pharmacia, Uppsala, Sweden)、0.5%のSDS、50mMのEDTA、0.05%のプロモフェノールブルー、0.05%のキシレンシアノールを含む10 μ lの負荷緩衝液を加えた。混合物を

1%のアガロースゲル上に負荷し、電気泳動後、エチジウムブロミド(0.5 μ g/ml)で染色した。サイズマーカーは、HindIII+ECO RI-消化したDNAであった。

種々の細胞を用いた抗-APO-1の活性

10⁴細胞のアリコートを、標準MAb(FI123又は13B1)あるいは抗-APO-1と共に100 μ lの培地中で4℃にて30分間インキュベートした。その後細胞を洗浄し、フルオレセインイソチオシアナート-カップリング単抗-マウスIgF(ab')₂(70 μ g/ml)を用いて染色し、サイトフルオログラフ(Ortho Diagnostic Systems, Westwood, Massachusetts)を用いて分析した。

トリチウム化チミジン吸収への抗-APO-1の影響の決定のために、細胞(1ウェル当たり10⁴)を、MAb(500ng/ml)の存在下で24時間培養し、 [³H]チミジンで2時間標識し、収穫した;表1のデータは、5%以下の変動を持つ二重培養の平均である。

患者からの白血病細胞を以下の要領で得た。患者から単離した奇形細胞は、形態学的に>95%芽であり、以下の表現型を示した:前T-ALL、細胞質CD3⁺、CD5⁺、CD7⁺、CD34⁺、Tdt⁺、CD2⁺、表面CD3⁺、CD4⁺及びCD8⁺;T-ALL、CD2⁺、細胞質CD3⁺、CD5⁺、CD7⁺及びTdt⁺、表面CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺及びCD34⁺;共通-ALL CD10⁺、CD19⁺、CD22⁺、CD24⁺、CD20⁺。これらの白血病細胞は正常な培養条件下で死んだので、これらの細胞に対する抗-APO-1の効果は、調べなかった。

正常なヒトリンパ球を以下の要領で得た。健康なボランティアからの採血血球細胞(PBMC)を、Ficoll Paque(Pharmacia Inc., Uppsala, Sweden)密度勾配法により単離した。プラスチック培養容器に終夜付着させることにより、付着細胞を除去した。記載の通り(20)、2-アミノエチルイソチオウロニウムブロミド(AET)-処理赤血球を用いたロゼット形成により、T細胞をPBMCから単離した。新しく調製した休止T細胞(ミリリットル当たり2 \times 10⁴;96%OKT11⁺、1%Tac⁺)を、植物凝集素-M(50 μ g/ml)及びPMA(10ng/ml)(Sigma Chemical Co., Munich, FRG)を用いて活性化した。7日及び12日後の2種類のT細胞に、20-30U/mlの組み換えヒトインターロイキン-2を加えた。12日活性化(90%OKT11⁺;60%Tac⁺)したT細胞(ミリリットル当たり5 \times 10⁴)をFI123又は抗-APO-1(1 μ g/ml)の存在下で24時間3重に培養し、さらに17時間 [³H]チミジンで標識した(上記参照)。

上記のロゼット形成を2回行うことにより休止B細胞(35.8%CD19⁺)を単離し、T. R. Jerrells, J. H. Dean, G. L. Richardson, D. B. Herberman, J. Immunol. Methods 32, 11 (1980)に記載の通りSephadex G-10カラムを経て分離した。活性化B細胞の場合、PBMCをミリリットル当たり2 \times 10⁴細胞に調製し、10 μ g/mlのボークフィードマイトゲン(Serva, Heidelberg, FRG)の存在下で6日間培養した。その後AET-処理赤血球

球を用いたロゼット形成及びFicoll Paque上の遠心を行って死細胞及びT細胞を除去した。中間相細胞を活性化B細胞(84% 1 g M^+)として使用した。

生体内における腫瘍成長への抗-APO-1の効果

BJAB細胞(4×10^7)を、 $\eta \mu / \eta \mu$ マウスの左腋窩に皮下注射した。5週間後(0日)、マウスの尾の静脈に500 μg のMAbを注射した。結果を図3にてグラフにより示す。標準MAb FII20(□): FII23(○): I3B1(△): 及び抗-APO-1(●)。14日後、腫瘍の底部でその大きさを測定した: 各マウスからの腫瘍を点で示す。

異種移植片における抗-APO-1の局在化

$\eta \mu / \eta \mu$ マウス中のBJABの異種移植片における抗-APO-1の局在化、及び腫瘍のアポトーシスの誘起を図4に示す。図4Aで上列は、MAbの静脈注射後12時間(1)、48時間(2)及び96時間(3)における腫瘍中の ^{125}I -標識MAb 抗-APO-1(マウス当たり50 μg 、50 μCi)の吸収を示す。下例は、それぞれ48時間における ^{125}I -標識MAb 抗-APO-1(治療に使用する通り500 μg : マウス当たり50 μCi)(4)及びFII20(標準MAb、BJABに結合: 50 μg 、マウス当たり50 μCi)(5)ならびに ^{125}I -標識FII23(標準MAb、BJABに非結合: 50 μg 、マウス当たり50 μCi)(6)の吸収を示す。

マウス当たり500 μg のMAbの静脈注射後10日、残存腫瘍細胞を除去し、ホルマリンで固定した。腫瘍のパラフィン切片を、ヘマトキシリン/エオシンを用いて染色した。

誘起されるものに対応する: 細胞質の濃縮、膜ブレッシング(図2a)、及びエンドヌクレアーゼ誘導による約180bpの多量体へのDNAのフラグメント化(図2b)(A. H. Wyllie, *Nature* 284, 555 (1980))。アフィニティー精製抗-APO-1は、成長の遅延及び細胞死を誘起し、これはアイソタイプ適合標準MAb(FII20) [抗-MHC(主要組織適合遺伝子複合体)クラスI抗原]あるいは非結合MAb FII23を用いると観察されなかった。わずかに10 ng/mlの濃度の抗-APO-1により、死細胞中への ^3H チミジンの導入の阻害ならびにトリパンブルー吸収の増加が観察され、200 μl 培養中の 10^4 SKW6、4細胞の成長が95%以上阻害された(図2c)。抗-APO-1により誘起される細胞死の特異性は、以下の追加の標準MAbがアポトーシスに関して不活性であることから明らかとなる: IgG3アイソタイプの18非結合及び9結合MAb(SKW6、4細胞上の蛍光抗体法により試験)、及びCD19、CD20、CD22、MHCクラスII、IgM(免疫グロブリンM)ならびにSKW6、4イデオタイプを含むSKW6、4細胞の細胞表面上の周知の抗原に向けたMAbのパネル。(単クローン性抗-CD19(HD37)及び抗-CD22(HD39)は、B. Dorke (Polyclinic of the University, Heidelberg, FRG)、及び単クローン性抗-CD20は、G. Moldenhauer (IV Leukocyte typing workshop and conference Vienna, Austria, 1989)の親切によりそれぞれ提供された。IgG3アイソタイプの18非結合及び9結合MAb(SKW6、4細胞上の

図4Bにおいて、左パネルは標準MAb FII20を用いた治療後の腫瘍を示す; 右パネルは、抗-APO-1を用いた治療後の腫瘍を示す。矢印は、宿主の血管を示す。最終的倍率は $\times 92$ 。MAbは、IODO-Gen法に従い(上記参照)、放射性ヨウ素化した。標準MAbを尾の静脈に注射し、あらかじめ決めた時点で動物をエーテル麻酔により殺した。腫瘍を切り出し、メチルセルロースに埋め込み、20 μm のクリオトーム切片を調製した。凍結乾燥した切片を、オートラジオグラフィのためのKodak X-omat ARフィルム上に置いた。

結果と議論

MAb(抗-APO-1)は、SKW6、4細胞の成長を阻害し、アポトーシスを誘起することが同定された。抗-APO-1(IgG3, x , $K_a = 1.9 \times 10^{-10}$)は、SKW6、4細胞の表面上の約 4×10^4 部位に結合した。抗体は、SKW6、4細胞からの内在合成タンパク質抗原(APO-1)を特異的に免疫沈降し、それは還元条件下にてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で52 kDの主バンドとして観察される(図1)。IgG3と非特異的に沈降するアクチン(43 kD)を別として、抗-APO-1は、25 kDの非主要バンドを特異的に沈降させる。この25-kDタンパク質は、分解生成物を示すか又は非共有結合により52-kDタンパク質と会合している。

核化真核細胞には、2つの主要な死の様式がある。例えば癌体の攻撃の結果としての壊死は、浸透性の向上による細胞の膨潤及び細胞膜の破裂を特徴とする。しかしアポトーシスを起こす細胞は、異なる生化学的及び形態学的パターンを示す。このパターンは、抗-APO-1によ

蛍光抗体法により試験)、及びMHCクラスII、IgMならびにSKW6、4イデオタイプに向けたMAbは、我々自身の研究所で調製した。)

抗-APO-1により誘起される細胞死は、細胞非依存性であり、無血清培養条件下、又は56°Cにて失活させた血清を加えた培地において起こった。それは、(i)形態及びDNAラダーの形成(図2a及びb)、(ii)外因的 Ca^{2+} 依存性、及び(iii)放射性標識の腫瘍からの ^{51}Cr の放出の遅延という点で、細胞依存性冷害により媒介される死と異なっていた。抗-APO-1により誘起される膜ブレッシングの速度(30分以内: 図2a)は、10 mMのEDTA又はEGTAの存在により影響を受けなかった。さらに抗-APO-1により誘起されるエンドヌクレアーゼ媒介DNAフラグメント化は、 Ca^{2+} チャネル遮断薬であるFuramycin(50 μg)又はNifedipine(50 μg)により阻害されなかった。 ^{51}Cr -標識SKW6、4細胞を抗-APO-1(1 $\mu \text{g}/\text{ml}$)と共に2、4、8及び24時間インキュベートすると、特異的 ^{51}Cr 放出[R. C. Duke, R. Chervenak, J. J. Cohen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 6361 (1983)]は、それぞれ2.9%、7.6%、21.3%及び32.5%であることがわかった。同一時点でトリパンブルー吸収を測定し: 細胞のそれぞれ2.5%、4.7%、10.6%及び73.6%がトリパンブルー陽性であった。対照的に、MAbプラス細胞の添加後2時間で、特異的 ^{51}Cr 放出は108.7%であり、細胞の92.7%がトリパンブルーにより染色された。これらの実験は、抗-APO-1誘起細胞死が抗体-及び細胞-依

存在細胞系と基本的に異なることを示している。

抗-APO-1の特異性を評価するために、腫瘍細胞系の限定されたパネルをAPO-1の発現及び成長阻害ならびにアポトーシスに対する感受性に関してスクリーニングした。APO-1は、種々のヒトリンパB及びT細胞系で発現し、手ながさる及びマウスT細胞系、あるいはヒト単球細胞系では見いだされなかった(表1)。各場合に、アポトーシスの誘起及びDNAラダーの形成を経た、表1に挙げたAPO-1-陰性細胞系の抗-APO-1遮断増殖が観察された。MAb(1 μ g/ml)の添加後2時間で、各細胞系のゲノムDNAを単離し、上記の装置でアガロースゲル上で分析した。抗-APO-1による³H]チミジン吸収の阻害は、ゲノムDNAのフラグメント化と平行していた。これは、標準MAb(13B1)を用いた処理後は観察されなかった。

APO-1の発現は、試験管内の細胞系に制限されず、患者から新しく単離した白血球細胞上でも見出すことができた(表1)。APO-1は、すべての白血球細胞上で見いだされるわけではないので、抗-APO-1が、白血病の下部集団を定義することができる。

我々は又、ヒトB及びT細胞をAPO-1の発現に関してスクリーニングした。休止B細胞上でAPO-1は検出されなかった。しかし活性化B細胞上でAPO-1は発現され(表1)、抗-APO-1で処理後3日までに、IgMの分泌が約4分の1に減少した。(活性化B細胞(ミリリットル当たり10⁶)は、1 μ g/mlのMAb F1123又は抗-APO-1の存在下でインキュベートした。3日後、培養上清み液を集め、HRPO-複合抗体-ヒトIgM(Medac, Hamburg, FRG)を含むヒトIgM-特異的ELISA法を用いてIg

M濃度を測定した。F1123又は抗-APO-1処理後のIgM分泌は、それぞれ2100及び550ng/mlであった。)

表1. 種々の細胞を用いた抗-APO-1の活性

細胞系	名称	APO-1に 陽性細胞の 割合(%)	相対的発光強度 (抗-APO-1 /標準)	(3H)チミジン吸収に対する MAbの影響(10 ³ cpm)	
				標準	抗-APO-1
ヒトB細胞	SKW6.4	98	11.1	30.0	0.02
	CESS	95	12.0	28.0	0.1
	BJAB	80	12.1	70.0	0.0
ヒトT細胞	OCI.LY1	0	1	14.5	7.8
	Jurkat	83	2.3	20.3	8.1
	Molt	91	2.4	35.7	0.6
ヒト骨髄細胞	CCRF. GEM	64	1.9	18.2	0.5
	U937	5	0.97%	62.2	60.5
	MLA 144	0	0.96	34.3	35.0
手ながさるT細胞	EL4	0	1	44.8	45.3
	B. M.	54	4.4		
	T-ALL	53	3.2		
マウスT細胞	D. A.	72	5.0		
	W. N.				
	共癌ALL				
T細胞	休止	3	1.36	22.4	0.23
	活性化	89	7.4		
	休止	0	0.9		
D細胞	活性化	91	1.1		

* H.U. ヒト; ALL. 急性リンパ球白血病

グロブリンT細胞は、APO-1を発現しなかった。しかし活性化T細胞は、APO-1を発現し、抗-APO-1は、これらの細胞のアポトーシス及び成長阻害を誘起した(表1)。従って我々のデータは、APO-1が活性化又は悪性リンパ球上に発現した種々特異的抗原であることを示唆している。

試験管内における抗-APO-1の簡便的な効果は、その効果を生体内における腫瘍成長に試すことを促した。エプスタイン-バルウィルス(EBV)-陰性のパーキット-類似リンパ腫BJABは、表1のB細胞パネルの抗-APO-1に最も感受性が低く、1細胞当たりわずか約1.5 $\times 10^4$ APO-1エpiteopしか発現しなかった(4)が、BJABを生体内試験に選んだ。この選択の理由は、BJABのみが非照射 $\eta\mu/\eta\mu$ マウス中で大きな腫瘍を成長させたことであった。BJAB細胞の注射の5週間後、 $\eta\mu/\eta\mu$ マウスは直径が約1.0から2.5cmの腫瘍を持つようになった(図3)。これらのマウスに精製抗-APO-1(マウス当たり500 μ g)又は同量の種々のアイソタイプ-適合標準抗体(F1120、抗-MHCクラスI抗原、細胞当たり5.8 $\times 10^4$ 単位を認認:又は2つの非結合MAb F1123及び13B1のひとつ)を静脈注射した。参照標準として、直径がそれぞれ1.5、1.8及び3.4cmのAPO-1-陰性B細胞腫瘍OCI.LY1を持つ3匹の $\eta\mu/\eta\mu$ マウスにも抗-APO-1(マウス当たり500 μ g)を注射した(OCI.LY1は、H. Messner, Ontario Cancer Institute, Toronto, Canadaから入手)(表1も参照)。抗-APO-1注射から2日後、BJAB腫瘍の白っぽい変色が観察され、続いて急速に腫瘍が進行

した。11匹の処理マウス中10匹で、14日以内に巨視的な腫瘍の進行が見られた。腫瘍抗体は、効果がなかった(図3)。さらに、OCI-LY1を持つマウスでは、予想どおり腫瘍の進行は観察されなかった。

注入抗体の滞した局在化及び濃縮を示すために、BJAB腫瘍組織の切片のオートラジオグラフィにより標識MAbを目で見えるようにした(図4a)。これらのオートラジオグラフにより、抗-APO-1の結合が腫瘍の周辺で著しく、中心で少ないことが示された。参照標準である結合MAb F1120は、定量的に類似の結合パターンを示した。参照標準非結合MAb F1123は、バックグラウンド上で局在化を示さなかった。さらに、標識抗-APO-1及びF1123を用いたペラ実験により(D. Prssman等, Cancer Res. 17, 845 (1957))、腫瘍におけるF1123に対する抗-APO-1の特異的濃縮が、48及び96時間後にそれぞれ4倍及び6倍であることが明らかになった。

我々の実験の主な目的は、抗-APO-1が生体内でも作用するかどうかを評価することであった。従って腫瘍を持つマウスに、MAb治療で用いる範囲の投与量の抗-APO-1の静脈注射を1回与えたのみであった。しかし他の治療計画で、MAbは繰り返し注射される(例えばS. L. Brown等, Blood 73, 651 (1989) 参照)。我々の実験の場合、腫瘍の進行が観察された10匹のマウス中3匹で、BJAB腫瘍の再増殖が観察された(図3)。再増殖は、最初の巨視的腫瘍進行の約3ヵ月後に、最初の腫瘍の縁で観察された。これらの腫瘍のひとつを取り、蛍光抗体法によりAPO-1を発現すること、及び最初の試験管内MJAB腫瘍細胞系と同様のMAb濃度で試験管内で抗-

APO-1に対して感受性であることを見出した(表1)。

進行BJAB腫瘍の組織構造の決定のために、MAb-処理 μ/μ マウスからの腫瘍の薄片を調製した。F1120の静脈注射の10日後BJABは、多数の有糸分裂といくつかの腫瘍巨細胞を持ち、アポトーシス像をほとんど持たない、密充填巨大芽から成る充実性腫瘍の様相を示した(図4b、左パネル)。腫瘍には、宿主血管が貫通していた。対照的に、残りのマウスの、抗-APO-1で処理したBJAB細胞のほとんどすべて(図4b、右パネル)は、血管周囲微小領域で最も顕著な核濃縮及び細胞死像を含む重大な細胞変性を示した。これらの形態上の変化は、アポトーシスの特徴である。

総括すると、アポトーシスが抗-APO-1により誘起され、これが生体内におけるBJAB腫瘍細胞の死及び進行の機構であることが示唆される。BJAB腫瘍細胞の細胞表面と強力に結合するF1120がBJABの進行を起こさなかったという事実により、キラー細胞又は抗-APO-1に結合した補体が成長障害及び腫瘍進行に含まれる可能性が排除される。

実施例2

材料及び方法

細胞培養増地及び試験:

すべての細胞は、L-グルタミン(最終濃度2mM)、ストレプトマイシン(100 μ g/ml)、ペニシリン(100U/ml)、HEPES(最終濃度25mM)及び10%牛胎児血清(FCS, Advanced Biotechnologies Inc., Silver Spring, MD)を補ったRPMI 1640中で培養した。組み替え

IL-2(最終濃度20U/ml)及び組み替えIL-4(最終濃度5ng/ml)をBoeringer Mannheim, FRGから購入した。培養は、相対湿度が90%の95%の空気及び5%のCO₂中、37℃に保った。

細胞系及びATL患者からの白血病細胞:

種々のHTLV-1形質転換T細胞につき調べた。C91/P1は、HTLV-1により形質転換された脾臓血T細胞系であり、継続的にIL-2の存在下の培養中に保った。使用した他のすべてのT細胞系は、ATL: JGCLを持つ患者から誘導し、DCLはIL-2依存性細胞系である。MJCL及びMT1は、IL-2非依存性細胞系であるが、IL-2に依存して増殖が向上する。CRI12及びHJT102は、原形HTLV-1陽性白血病細胞系であり、この細胞系においてHTLV-1が最初に記載された。これらの細胞系の成長は、増地中のIL-2に依存しない。

原形APO-1陽性及び抗-APO-1感受性細胞系として、B細胞系SKW6.4を参照標準としてすべての実験に含んだ。Trauth B. C., Klas C., Peters A. M. J., Matzku S., Moller P., Falk W., Debatin K-M., Drämmér PH. "Monoclonal antibody-induced tumor regression by activation of an endogenous suicide programme." Science 1989; 245: 301-305.

ATLを持つ5人の患者からの解凍白血病細胞を、実験に使用した。

白血病細胞カウント数の高い患者からの細胞を凍らせ、20%のFCS及び10%のDMSOを含む増地中で液体窒素中に保存した。注意深く解凍した後、細胞のかかりの量の損失があり、これはATL細胞に特徴的であるようだ。密度勾配遠心により解凍後、生存細胞を単離し(LS M. Organon Technika Corp., Durham, N. C.)、後の実験のために試験管内で培養した。

蛍光抗体分析

以下の抗体を用いた流動細胞計測法により、蛍光抗体染色を測定した: 抗-Tac-抗体は、1 μ g/10⁶細胞で使用した。抗-APO-1(IgG3.)及びアインタイプ適合標準非-結合抗体は、最初のハイブドーマ上澄み液の10%希釈として使用した。CD3、CD4、CD8に対する抗体は、Becton Dickinson (Mountain View, CA.)から購入し、製造者の指示に従って使用した。細胞表面染色の場合、100 μ l増地中の1 \times 10⁶細胞を、1%のFCS及び0.3%のNa-アジドを含むリン酸緩衝食塩水(PBS)中で適度に希釈した抗体の希釈液と共にインキュベートした。抗体の添加の前にヒトIgGを、最終濃度100 μ g/mlまで加えた。30分間のインキュベートの後、細胞を洗浄し、第2のFITC標識単-抗-マウスIg抗体(TAGO Burlingame, Ca)と共にインキュベートした。

細胞増殖

指示された細胞濃度における細胞増殖を、96ウェル平底プレート(Coster, Cambridge, Mass.)中で決定した。指示された時間の後、0.1 μ Ciの[³H]チミジン(³H-TdR, D

特表平5-503281 (8)

upont NEN, Boston, Mass.) を各培養ウェルに加えた。プレートを取り出し、³H-TdRの吸収を液体シンチレーションカウンタで決定することにより、増殖を評価した。

細胞死

抗-APO-1抗体と共に細胞をインキュベートした後、トリパンブルー色素排除法により生存率及び細胞死を決定した。

結果

HTLV-1陽性T細胞系上でのAPO-1の発現

最初にATLを持つ患者から得た種々のT細胞系上でのAPO-1抗原の発現を調べた。蛍光抗体染色により、使用したすべての細胞系は特徴的な成熟T細胞表現型を示した(CD4⁺、CD8⁻、Tac⁺)。JGCL細胞系のみがCD4⁺、CD8⁻、Tac⁺であった。すべての細胞系上でAPO-1の強い発現が見出された。APO-1発現の強度は、活性化正常T細胞又はAPO-1陽性B及びT細胞系上で見られる発現と同程度であった。

HTLV-1陽性T細胞系の増殖の阻害及び抗-APO-1誘起アポトーシス

抗-APO-1によるHTLV-1陽性細胞系の成長阻害及びアポトーシスを評価するために、種々の濃度の抗-APO-1の存在下で細胞系を2日間試験管内培養した。参照標準として、対応する培養を10 µg/mlのアイソタイプ適合非結合標準抗体と共にインキュベートした。調べたすべてのT細胞系の増殖は、抗-APO-1抗体により阻害された。各実験に正の標準として、最初に抗-APO-1を誘起するのに使用したBリンパ芽球系であり(実施例1を参照)抗-APO-1

感受性の高い細胞系であるSKW6.4を含んだ。例えばJGCL及びMJCLなどの種々の細胞系の成長阻害は、SKW6.4細胞系の成長阻害と量的に同等であった。

すべての感受性の高い細胞系は、抗-APO-1と共にインキュベートした後、アポトーシスの独特の形態的特徴を示した(膜プレビング、核及び細胞質の濃縮)。トリパンブルー色素排除法によると、抗-APO-1と共に2日間インキュベートした後、50-98%の細胞が死んでいた。

培養ATL細胞上でのAPO-1の発現

HTLV-1陽性T細胞系上での抗-APO-1によるAPO-1発現及びアポトーシスの誘起を調査した後、APO-1がATLを持つ患者からの白血病細胞上でもAPO-1が発現するかどうかを調べた。凍結凍融血球(50%以上の悪性T細胞)からの解凍細胞につき調べた。解凍後のATL細胞の回収率は通常低い。解凍後の回収率は、2-35%の範囲であった。これらの細胞は、低いTac及び変動のあるAPO-1発現を示した(それぞれ3-15%及び1-53%)。さらに調べるため、IL-2を補った培地中で細胞を5日間培養した。このような条件下でATL細胞のAPO-1及びTac発現は、増加した。この場合もAPO-1発現の強度は、HTLV-1形質転換T細胞系上、及び活性化T細胞又は悪性TあるいはB細胞系などの他の感受性細胞上の発現強度と同程度であった。

試験管内のATL細胞の増殖に対する抗-APO-1の影響

培養ATL細胞上でAPO-1が発現したので、抗-APO-1がこれらの細胞を試験管内で阻害するかどうか調べた。ATL細胞を、培地

のみ、あるいは培地プラスIL-2及びIL-4中で培養した。細胞をIL-2又はIL-4中で培養する理由は、ATL細胞が前以て活性化することなくIL-2又はIL-4に増殖応答を示すことがあるからである。Arima N., Daitoku T., Ohgaki S. 等, "Autocrine growth of interleukin-2 producing cells in a patient with adult T cell leukemia", Blood 1986;68:779-782; Uchiyama T., Kamio M., Kodaka T等, "Leukemic cells from some adult T cell leukemia patients proliferate in response to interleukin-4" Blood 1988:72:1182-1186. 表1は、患者1及び4からのATL細胞がすでに自然に高度に増殖したことを示す。患者3、4及び5からの細胞の場合は、増殖がIL-2又はIL-4の添加により増大した。培養への抗-APO-1の添加により、悪性細胞の増殖が非常に阻害された。標準抗体とのインキュベーションは、影響を与えなかった。

表2. 試験管内のATL細胞の増殖に対する抗-APO-1の影響
細胞を得た インキュベーター 培地中の細胞 抗-APO-1に
患者の番号 ション条件 増殖 (cpm) よる成長阻害 (%)

1	培地	24682	82
	IL-2	18872	73
	IL-4	49343	61
2	培地	測定なし	-
	IL-2	110167	99
	IL-4	43674	99
3	培地	420	18
	IL-2	3700	89
	IL-4	5253	97
4	培地	36672	48
	IL-2	46716	52
	IL-4	61503	60
5	培地	629	10
	IL-2	1724	71
	IL-4	2110	81

解凍後、96ウェル平底プレート中で2x10⁴細胞/ウェルを培養した。指示した場合はIL-2(20U/ml)又はIL-4(5ng/ml)を加えた。培地のみ、又は1 µg/mlの抗-APO-1あるいは1 µg/mlのアイソタイプ適合標準抗体の存在下で、細胞を3日間培養した。培養の最後の8時間に、0.5 µCiの³H-TdRを加えた。³H-TdRの吸収の決定により増殖を測定した。データは、培地の

ろの培養の場合の絶対値 cpm (平均) として (cpm 標準)、及び抗-APO-1 による H-TdR 吸収の阻害のパーセントとして示す。三重の培養に関する標準偏差は 10% 以下であった。アイソタイプ適合標準抗体を用いたインキュベーションは、培地のみの培養と比較して影響がなかった (示していない)。

試験管内における抗-APO-1 処理による培養 ATL 細胞のアポトーシスの誘起

抗-APO-1 による ATL 細胞のアポトーシスの誘起を調べるために、解凍 ATL 細胞を最初に IL-2 (20 U/ml) の存在下で 5 日間培養した。この培養の間に細胞数の正味の上昇は見られなかった。その後培養細胞をそれぞれ 1 µg/ml の抗-APO-1 又は標準抗体と共に 48 時間インキュベートした。このような条件下で、抗-APO-1 処理後、ATL 細胞の 75-100% が死んだ。

結論

ATL を持つ患者から得たすべての HTLV-I 陽性 T 細胞系は、APO-1 を発現することが見出された。これらの細胞を抗-APO-1 と共にインキュベートすると、活性化 T 細胞の場合と類似のアポトーシスの誘起により増殖が阻害される。抗-APO-1 媒介アポトーシスに関する HTLV-I 陽性 T 細胞系の感受性は、種々の細胞系で異なる (50% の成長阻害に必要な抗体濃度: 70-500 ng/ml < JGCL 及び MJCL >、及び 1000-2000 ng/ml < HUT 102 及び C91/P1 >)。最も感受性の高い細胞系 (JGCL 及び MJCL) は、抗体を誘起するのに用い、前の実験で最も感受性が高いことがわかった細胞系 (SKW6, 4) と同程度に感受性であった。興味

深いことに、JGCL 及び MJCL の増殖は、外因性 IL-2 に依存するようであった。これは、IL-2 応答性と抗-APO-1 誘起アポトーシスに関する感受性の間の関連性を示唆している。

ATL を持つ患者からの末梢血からの培養細胞上でも APO-1 の発現が見られた。そのような患者からの解凍細胞は、解凍後の生存率が低すぎて直接調べることができなかった。しかし培地のみ、又はサイトカイン (IL-2 又は IL-4) の存在下の試験管内で培養すると、これらの細胞は APO-1 を発現することがわかった。これらの細胞を試験管内で抗-APO-1 で処理すると、増殖ならびに IL-2 及び IL-4 増大増殖応答を同時に強力に阻害した。最後に増殖の阻害にはアポトーシス性細胞死の誘起が伴った。培養 ATL に関するこれらのデータは、正常 T 細胞の場合に得たデータと対照的である。正常 T 細胞の場合は、APO-1 の発現にマイトジェンを用いた予備的活性化が必要であり、抗-APO-1 処理は、短期増殖に影響を与えない。

総括すると、APO-1 の発現が HTLV-I 形質転換 T 細胞系及び ATL を持つ患者からの培養悪性 T 細胞の特徴であることが示された。これらの細胞及び細胞系を抗-APO-1 抗体と共にインキュベートするとアポトーシスを誘起する。

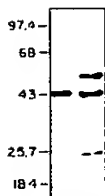


FIG. 1

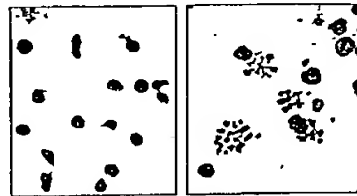


FIG. 2A

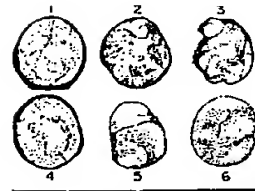


FIG. 4A



FIG. 2B

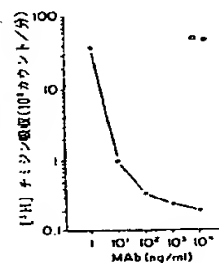


FIG. 2C

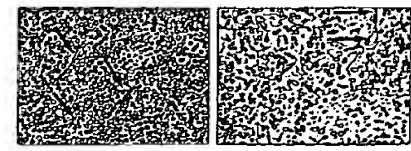


FIG. 4B

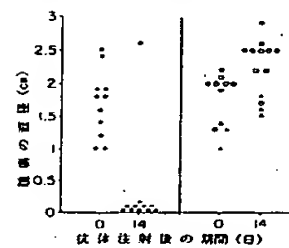


FIG. 3

平成4年7月16日

特許庁長官 麻 生 稔 殿

1. 特許出願の表示

PCT/EP90/00111



2. 発明の名称

細胞アポトーシスを伴う細胞表面抗原

3. 特許出願人

住 所 ドイツ連邦共和国デー69000ハイデルベルク・
ビーオーボックス10 19 49

名 称 ジャーマン・キャンサー・リサーチ・センター

4. 代理人 〒107

住 所 東京都港区赤坂1丁目9番15号

日本自転車会館

氏 名 (6078) 弁理士 小田 島 平 吉

電 話 3585-2256



5. 補正書の提出年月日

1991年12月19日

6. 添付書類の目録

(1) 補正書の写し(翻訳文)

1通

病細胞などの細胞におけるアポトーシスの選択的誘導は、有用な治療手段であることを証明することができた。

アポトーシスの誘起による単クローン性抗体-細胞傷害誘導は、*Science*, Vol. 245, 1989年7月, pp301-305に記載されている。

本発明は、細胞アポトーシスを伴う抗原と特異的に結合する抗体と感染細胞を、抗体媒介細胞アポトーシスに適した条件下で接触させることを含む、HTLV-1ウィルスに感染した細胞の増殖を阻害する方法、ならびに細胞アポトーシスを伴う抗原と特異的に結合する抗体と細胞集団を、抗体媒介細胞アポトーシスに適した条件下で接触させることを含む、HTLV-1ウィルスに感染した細胞集団の質的パーセントを殺す方法に関する。APO-1は細胞アポトーシスを伴い、分子量が約52 kDであり、活性化及び悪性リンパ球により発現する。APO-1への抗体の結合はアポトーシスを引き起こし、従って抗体又は類似結合剤を、APO-1抗原を持つリンパ球腫瘍細胞などの細胞において成長阻害又はアポトーシスを起こすのに使用することができる。

図1は、APO-1の分子量決定のためのSDSポリアクリルアミド電気泳動ゲルのオートラジオグラムを示す。

図2は、抗-APO-1による成長阻害及びアポトーシスの誘導を示す。

図3は、マウスにおけるリンパ腫の抗体-APO-1誘導進行を示す。

図4は、リンパ球腫瘍の異種移植における抗-APO-1抗体の局在化を示す。

細胞表面分子は、リンパ球成長調節において重要な役割を果たす。そのような分子は、成長刺激サイトカインのレセプターとして機能するか、又はレセプターと共働して成長調節に必須の信号を伝達することができる。レセプター封鎖又は刺激サイトカインの除去により、リンパ球の成長を減退させることができる。例えばインターロイキンがないとヒトリンパ球の成長は遅くなり、最終的に「計画的細胞死」又はアポトーシスと呼ばれる細胞死の特徴的形態に至る。E. Duvall and H. H. Wyllie, *Immunol. Today* 7, 115 (1986)。アポトーシスは、真核細胞死の最も普通の形態であり、胚形成、変態、組織萎縮及び腫瘍進行において起こる。A. H. Wyllie, J. F. R. Kerr, A. R. Currie, *Int. Rev. Cytol.* 68, 251 (1980)。又これは、細胞障害性Tリンパ球及びナチュラルキラーならびにキラー細胞により、腫瘍細胞死因子(TNF)及びリゾフォトキシン(LT)などのサイトカインにより、及びグルココルチコイドによっても起こる。アポトーシスの特徴的徴候は、核の分割、細胞質の濃縮、膜ブレbbing(ゼイオシス)及びDNAの約180塩基対の多量体へのフラグメント化("DNAラダー"と呼ばれる)である。

最近、抗-CD3が試験管内で未成熟リンパ球のアポトーシスを引き起こすことが示された。C. A. Smith等, *Nature* 337, 181 (1989)。CD3-誘起アポトーシスが、胸腺のT細胞の数の選択を阻害することが示唆された。

抗原APO-1は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により決定する分子量が約52 kDの細胞膜抗原である。APO-1は、活性化された正常なヒトリンパ球、及びB細胞、T細胞ならびにHTLV-1-付随悪性細胞、例えば成人T細胞白血病細胞などを含むリンパ球腫瘍細胞により発現する。抗-APO-1抗体の細胞への結合によりAPO-1が発現し、成長阻害及び/又はアポトーシスを起こす。この効果は、抗体非依存性であり、抗体のみによって媒介される。

APO-1は、抗原を発現する細胞(リンパ球など)の細胞膜から従来の方法により単離することができる。さらにAPO-1をコードする遺伝子をクローニングして発現させ、単離抗原又はその一部を得ることができる。単離APO-1を免疫原として使用し、抗-APO-1抗体(多クローン性又は単クローン性)を誘起する、あるいはハイブリドーマによる抗-APO-1抗体、トランスフェクションした骨髄腫によるキメラ抗-APO-1抗体、又は形質転換バクテリア細胞による1電極抗体-APO-1抗体の製造のためのスクリーニングを行うことができる。

APO-1に結合する抗体は、APO-1を発現する細胞中における細胞成長の阻害又はアポトーシスの誘導に有用である。この目的の場合、単クローン性抗-APO-1抗体が好ましい。単クローン性抗-APO-1抗体は、連続的(生存)安定抗体-生産細胞系により製造する。好ましい抗体-生産細胞系は、ハイブリドーマ細胞系である。しかし原則的に細胞系は、抗-APO-1特異性のし及び/又はH鎖の可変領域をコードする遺伝的転写遺伝子を含む、発現することができるどのような細胞からも誘導することができる。細胞系は、即ち能動的抗体又は抗

体フラグメントに組み立てる能力を有することが好ましい。従って自然に免疫グロブリンを生産するリンパ球が好ましい。

単クローン性抗体-APO-1抗体を生産するハイブリドーマ細胞は、Kohler and Milstein, nature 256:495 (1975) の標準細胞ハイブリッド形成法により作ることができる。簡単に言うとう方法は、以下の通りである：APO-1を持つ全細胞又はそれらの細胞の細胞膜を用いて動物を免疫感作することにより単クローン性抗-APO-1抗体を生産する。代わりに、精製又は部分的精製APO-1、あるいはAPO-1の1個又はそれ以上の免疫原エピトープを持つペプチドセグメントを用いて動物を免疫感作することができる。そのようなペプチドは合成し、キーホルリンペットヘモシアニンなどのキャリアタンパク質と複合化し、免疫原として使用することができる。

免疫感作に好ましい動物は、マウスである。種々の免疫感作法を使用することができる。例えばマウスに約107のAPA-1-保持細胞を、週に1度、4週間かけて腹腔内注射により与えることができる。

その後免疫感作動物から抗体-生産リンパ球（例えば脾臓リンパ球）を得、生存細胞（好ましくは骨髓腫又は真性骨髓腫）と融合させる。多くの適した骨髓腫細胞が、文献により周知である。マウスハイブリドーマの場合の例として、骨髓腫P3, X63, Ag8, 653がある。Kohler and Milstein, 同上を参照。脾臓細胞と融合相手の融合は、ポリエチレングリコールの存在下で確立された方法に従うことができる。電気融合法も使用することができる。

得られた雑種細胞をクローン培養した後、抗-APO-1抗体の生産

に関してスクリーニングする。ハイブリドーマを、APO-1抗原を発現する細胞系に対してアポトーシスを誘起する抗体の分泌に関してスクリーニングすることができる。そのような細胞系の例は、悪性ヒトB細胞系SKW6, 4である。さらの別の細胞系を下表1に示す。精製又は部分的精製APO-1を、APO-1特異性の抗体を分泌するハイブリドーマに関する、標準的免疫吸着剤分析によるスクリーニングに使用することができる。

動物の抗体はヒトの治療に有用であり得るが、動物の抗体を変換してヒトによる耐性がより高い形態にすることが好ましい。マウス又は他の動物中で生産した単クローン性抗体を、標準的方法によりキメラ動物/ヒト抗体又は“ヒト類似”抗体に変換することができる。

抗-APO-1抗体の類似体のAPO-1-結合フラグメントも製造することができる。例えば酵素消化によりF(ab')₂、Fab及びF₁を製造することができる。さらにFab及びF₁類似体（一重鎖抗体）に相当する合成オリゴペプチドを、バクテリア細胞中で遺伝子工学法により製造することができる。

抗体を用いてリンパ球（正常又は悪性）あるいはAPO-1を持つ他の細胞中に成長阻害又はアポトーシスを誘起することができる。例えば抗-APO-1抗体を使用してAPO-1抗原を持つ腫瘍を治療することができる。上記の通り、APO-1を発現する種々の種類の悪性リンパ球において、抗体により成長阻害及び/又はアポトーシスを誘起することができる。これらの悪性リンパ球には、悪性B又はT細胞が含まれる。特に成人T細胞白血病、HTLV-1付随腫瘍を抗-APO-1抗体を用いて治療することができる。さらにAPO-1を持つ非リン

パ球腫瘍は、抗体治療に関する候補である。

APO-1を持つ細胞の成長阻害又はアポトーシスを誘起する量の抗-APO-1抗体を、腫瘍に苦しむ患者に投与する。有効な抗-腫瘍投与及び投与量は、種々の腫瘍の種類に関して決定することができる。一般に抗体は、食塩水などの薬液用ビヒクルに溶解して静脈注射により与えることができる。

APO-1を発現するリンパ腫は、体外的に治療することもできる。血球又は白血球を患者から取り除き、腫瘍細胞を減少させる又は除去するのに十分な量の抗-APO-1抗体と接触させる。処置後、血球又は白血球を患者に戻す。

以下の実施例により、発明をさらに説明する。

実施例

実施例1

方法

抗-APO-1抗体の製造

1週間に一度づつ4週間かけて 1×10^7 のSKW6, 4を腹腔内注射することにより、BALB/cマウスを免疫感作した。最後の注射から4日後、免疫感作動物からの脾臓細胞をP3, X63, Ag8, 653骨髓腫と融合した[G. Kohler and C. Milstein, Nature 256, 495 (1975)]。融合後12日に、SKW6, 4細胞の成長に関して陽性のウェルからの培養上澄み液を、SKW6, 4細胞の成長を阻害する能力に関して調べた。阻止単クローン性抗体(MAb)を生産するハイブリドーマを、1ウェル当たり0.5細胞の濃度における限界希釈により3回クローニングした。タンパク質

A-Diasorbカラム(Diagen, Dusseldorf, FRG)を用いて無血清培養上澄み液からMAbを精製した。結合MAbを、0.1M NaCl及び0.1Mグリシン、pH2.8を用いて溶離し、リン酸塩緩衝食塩水に対して透析し、滅菌した。

請 求 の 範 囲

1. 細胞アポトーシスを伴う抗原と特異的に結合する抗体と感染細胞を、抗体媒介細胞アポトーシスに通じた条件下で接触させることを含む、HTLV-1ウィルスに感染した細胞の増殖を阻害する方法。
2. 抗原がAPO-1抗原である、請求の範囲1に記載の方法。
3. 抗体が単クローン性抗体である、請求の範囲2に記載の方法。
4. 細胞アポトーシスを伴う抗原と特異的に結合する抗体と感染細胞を、抗体媒介細胞アポトーシスに通じた条件下で接触させることを含む、HTLV-1ウィルスに感染した細胞集団の実質的パーセントを殺す方法。
5. 抗原がAPO-1抗原である、請求の範囲4に記載の方法。
6. 抗体が単クローン性抗体である、請求の範囲5に記載の方法。

国 際 調 査 報 告

International Application No. PCT/EP 90/00111

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER by technical classification symbols only, indicate only

IPC Class. A 61 K 39/395, C 07 K 15/28, 15/08, C 12 N 5/16
C 12 P 21/78

2. CITATION OF PRIOR ART

IPC Class. A 61 K; C 07 K; C 12 N

3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Number of Documents	Relevant to the Invention	Relevant to the Prior Art
A	1	SCIENCE, Vol. 245, July 1989, B.C. Trath et al.: "Monoclonal Antibody-Mediated Tumor Regression by Induction of Apoptosis", see page 301 - page 305 and the whole document	1,2,5,6-13,15
A	1	Dialog Informational Service, File 154: Medline 83-90/Oct, accession no. 07153202, Medline accession no. 90060202, Takahashi S. et al.: "DNA fragmentation and cell death mediated by T cell antigen receptor/CD3 complex on a leukemia T cell line", & Eur J Immunol (GERMANY, WEST) Oct 1989, 19 (10) p1911-9	1,2,6-13

4. CERTIFICATION

Date of the Invention: 11th September 1990

Date of filing of the International Patent: 27.09.90

Signature of the Applicant: MME N. KUIPER

Signature of the Patent Office: [Signature]

国 際 調 査 報 告

International Application No. PCT/EP 90/00111

SA 13696

02/08/90

This patent is hereby made available to the public in accordance with the provisions of the European Patent Convention.

The European Patent Office is not responsible for the accuracy of the information contained in this report.

Patent number	Publication date	Patent family	Publication date
EP-A2- 0311438	12/04/89	NONE	

For more details, please refer to the International Patent Office (IPO) website at: <http://www.epo.org>

International Application No. PCT/EP 90/00111

1. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

Category	Number of Documents	Relevant to the Invention	Relevant to the Prior Art
A	1	NATURE, Vol. 337, January 1989, C.A. Smith et al.: "Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures", see page 181 - page 184	1-16
A	1	Dialog Informational Service, File 154: Medline 83-90/Oct, accession no. 05102478, Medline accession no. 84020476, Acuto O. et al.: "The human 'T' cell 'receptor': appearance in ontogeny and biochemical relationship of alpha and beta subunits on IL-2 dependent clones and T cell tumors", & Cell Oct 1983, 34 (3) p17-26	1
A	1	Dialog Informational Service, File 154: Medline 83-90/Oct, accession no. 05218500, Medline accession no. 87192500, Schwartz A. et al.: "Immunoprecipitation of the interleukin-2 receptor from Hodgkin's disease derived cell lines by 'monoclonal' antibodies", & Hematol Oncol Jan-Mar 1987, 5 (1) p57-64	1
T	1	SCIENCE, Vol. 248, June 1990, M. Blackman et al.: "The Role of the T Cell Receptor in Positive and Negative Selection of Developing T Cells", see page 1335 - page 1341 and the whole document	1-6
A	1	EP, A2, 0311438 (BILLING, RONALD JAMES) 12 April 1989, see the whole document	1

For more details, please refer to the International Patent Office (IPO) website at: <http://www.epo.org>

第1頁の続き

⑤Int.Cl.⁵

A 61 K 39/395

識別記号

庁内整理番号

ADY	G	8413-4C
	N	8413-4C
	S	8413-4C
	T	8413-4C
	U	8413-4C
ADU	E	8413-4C

// C 12 N 5/20
 15/06
 C 12 P 21/00
 21/08
 (C 12 P 21/00
 C 12 R 1:91)
 (C 12 P 21/08
 C 12 R 1:91)

A 8214-4B
 8214-4B

THIS PAGE DIARRH (SPTO)